

THESIS

Muench

1963

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

**Einwirkung
von ATP auf Herzmuskelextrakte im
Elektropherogramm**

Angelika *Rugienius*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

**Einwirkung
von ATP auf Herzmuskelextrakte im
Elektropherogramm**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Rugienius
aus Kaunas (Litauen)

München 1963

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Herbert NOWY
Mitberichterstatter: Professor Dr. Walter SEITZ
Dekan: Professor Dr. Alexander HERRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1963

Angewandte Medizin
vorgelegt von
Angelika Hagenberg
aus Kärnten (Austria)

München 1963

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	5
II. Eigene Versuche	8
1. Methodik	8
2. Ergebnisse	10
3. Diagramme	15
III. Diskussion	19
IV. Zusammenfassung	21
Literaturverzeichnis	25
Lebenslauf	28

I. EINLEITUNG

Einer der unmittelbar wichtigsten Faktoren für die Muskelaktivität ist das Adenosintriphosphat (ATP). Durch seine hydrolytische Spaltung wird chemische Energie für die Muskelkontraktion bereitgestellt. Bei dieser Reaktion spielt das Myosin als Träger der Adenosintriphosphatase (1, 2) eine entscheidende Rolle. Das Adenosintriphosphat bewirkt andererseits am Myosin, insbesondere aber auch am Actomyosin Veränderungen, die vor allem die physikalischen Eigenschaften dieser Eiweisskörper betreffen.

So fanden 1939 ENGELHARDT und LJUBIMOWA, dass ATP die Dehnbarkeit von Myosinfäden beträchtlich erhöht (3). SZENT-GYÖRGYI beobachtete, dass Myosinfäden in einer verdünnten ATP-Lösung, die noch bestimmte Salze enthielt ($\mu = 0,15$), schrumpften. In Abwesenheit von ATP trat in der gleichen Lösung keine Schrumpfung des Myosins auf. Mit Extrakten, die reich an Actomyosin waren, war der Effekt noch stärker (4, 5). 1941 entdeckte NEEDHAM mit seinen Mitarbeitern, dass, wenn ein Myosinsol mit Adenylpyrophosphat (= ATP) vermischt wird, sofort eine Verminderung der Intensität der Strömungsdoppelbrechung auftritt. Als eine weitere Wirkung des ATP beschrieben sie die Viskositätsabnahme des Extraktes (6). SZENT-GYÖRGYI bestätigte diese Befunde und erweiterte sie dahingehend, dass durch ATP die Lichtstreuung und die Löslichkeit des Actomyosins beeinflusst wird. Weiterhin fand er, dass Actomyosinlösungen auf Zusatz von ATP hin die Eigenschaften von Myosinlösungen annehmen. Daraus folgerte er, dass Actomyosin eine Verbindung von kristallisierbarem Myosin mit dem von STRAUB isolierten Actin sei (8, 7). H.H. WEBER beschreibt eine ähnliche Beobachtung: auf Zusatz einer genügenden Menge ATP fallen die Sedimentationskonstanten der S-Myosine reversibel auf die Werte des L-Myosins ab. Dagegen verschwindet die Sedimentationskonstante des L-Myosins, wenn dieses mit einer ausreichenden Menge Actin versetzt wird und es tritt wieder die Sedimentationskonstante eines S-Myosins auf. Die Viskosität der S-Myosine fällt auf ATP-Zusatz ungefähr auf den Wert des L-Myosins (9, 10). Auch Annemarie WEBER konnte an Hand von Versuchen mit der Ultrazentrifuge zeigen, dass sich deutliche Unterschiede ergaben zwischen Actomyosinlösungen mit und ohne Zusatz von ATP. Nur in Gegenwart von ATP ($4-5 \times 10^{-3}$ m) sedimentiert Actomyosin mit der gleichen Geschwindigkeit wie L-Myosin, wohingegen die höheren Sedimentationskonstanten wieder erscheinen und der niedrige Gipfel verschwindet, wenn das ATP dephosphoriliert ist. Die Reaktionsprodukte des Actomyosin-Sols mit ATP wurden aus der überstehenden Flüssigkeit bzw. aus dem Zentrifugationsrückstand gewonnen und auf Grund ihrer charakteristischen Eigenschaften als L-Myosin und Actin erkannt (11).

NODA und MARUYAMA haben die Experimente von A. WEBER wiederholt und bestätigt, dass die Strömungsdoppelbrechungseigenschaften des im Überstand befindlichen Proteins genau die gleichen sind, wie die von Myosin A (= Myosin). In ihrer Doppelbrechungsstudie haben sie aber vor allem die Wechselwirkung zwischen Myosin B und ATP untersucht. Sie stellten, wie schon früher die NEEDHAM-Gruppe, fest, dass ATP die Strömungsdoppelbrechung von Myosin B (= Actomyosin) herabsetzt u. zw. bereits in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{m}$ (12).

Es ergibt sich nun die Frage, ob die beschriebenen Veränderungen, von denen angenommen wurde, dass sie durch das ATP verursacht werden, nicht auch durch andere Substanzen oder gar durch Veränderung des Milieus hervorgerufen werden können.

S. KOREY hat das Verhalten einer nicht leitenden Muskelfaser bei Zusatz von einer Reihe von Verbindungen studiert und ist zu folgenden Ergebnissen gekommen: nur Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) verursachen eine Kontraktion der Faser, wobei das ATP 10 mal wirksamer ist als das ADP. Adenosinmonophosphat (AMP), anorganisches Pyrophosphat und viele andere Substanzen wie Adrenalin, Acetylcholin, Eserin u. ä. üben auch in hohen Dosen keine Wirkung auf das Faserpräparat aus (13). Dass man jedoch Faserpräparate und Lösungen in ihrem Verhalten nicht gleich beurteilen darf, darauf weist H. H. WEBER hin, indem er feststellt, dass Pyrophosphat auf Actomyosinlösungen ähnlich oder gleich wirkt wie ATP, während es den Actomyosinfäden nicht beeinflusst (9). Doch auch NEEDHAM stellt fest, dass bei Zusatz von anorganischem Pyrophosphat zu Myosinlösungen der Abfall der Strömungsdoppelbrechung fehlt oder ganz gering ist (9). Dagegen haben NODA und MARUYAMA beobachtet, dass in Gegenwart von genügend Mg^{++} Pyrophosphat in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5} \text{m}$ ähnlich wirksam ist wie ATP. Dass der NEEDHAM-Gruppe diese Beobachtung entging, führen sie darauf zurück, dass diese keine Mg^{++} verwendet haben (12). Auch AMBERSON, ERDÖS und Mitarbeiter folgerten aus der Tatsache, dass sie nach ihrer Methode der "milden Extraktion" nur dann Myosin gewinnen konnten, wenn der Extraktionslösung Pyrophosphat zugesetzt wurde, dass dieses die Bindung Actin-Myosin löst (14). Demgegenüber steht die Theorie von ENGELHARDT, dass Myosin anorganisches Pyrophosphat nicht zu hydrolysieren vermag (15). Während, wie schon erwähnt, durch ADP die gleichen Effekte erzeugt werden können wie durch ATP, ist das durch Zusatz von Adenylsäure nicht möglich (6, 13). Für die Wirkung der Myosin-ATP-ase ist die Triphosphatstruktur des Substrates Vorbedingung. Dagegen scheint die Nucleosidgruppe nicht von entscheidender Bedeutung zu sein, denn das Enzym spaltet auch Inosintriphosphat (ITP), Uridintriphosphat (UTP), Cytidintriphosphat (CTP) und Guanosintriphosphat (GTP) (15, 16).

Auch was die Wirkung von Ionen auf Myosinlösungen betrifft, sind die Autoren verschiedener Meinung. So fanden NEEDHAM und Mitarbeiter, dass bestimmte Ionen sogar in einer Konzentration von 1 - 2 M bei **weitem** nicht so wirksam sind wie ATP in 0,1 molarer Konzentration (6). Dagegen schreiben NODA und MARUYAMA, dass KCl in Konzentrationen höher als 1 M einen ähnlichen Effekt auf die Strömungsdoppelbrechung ausübe, wie ATP; bei Verwendung von KOH oder KJ ist er noch deutlicher als durch ATP (12). Man weiss, dass konzentrierte KCl-Lösungen und Lösungen von pH 7 - 8 Viskositätsniedrigung künstlicher Actomyosinlösungen hervorrufen können; doch ist diese Veränderung bei Verwendung natürlicher Actomyosine nur bei Kombination erhöhter Ionenstärke (0,75 - 1,7) mit alkalischem pH (7,5 - 8,0) und längerer Wirkungsdauer reproduzierbar und ist in den meisten Fällen nicht rückgängig zu machen (10). Hier aber muss man sich fragen, inwieweit diese Veränderungen noch als natürlich anzusehen sind und es sich nicht um Denaturierungsvorgänge handelt. Die durch das ATP verursachten Effekte sind dagegen immer reversibel (7, 10, 11, 12).

Es wäre noch zu erörtern, welche chemischen Veränderungen das Actomyosinmolekül durch die Einwirkung von ATP erfährt. Viele Autoren vertreten die Auffassung, dass ATP die Dissoziation des Actomysins in Actin und Myosin bedingt (9, 10, 11, 14, 15). Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass es einigen von ihnen gelang, die Reaktionsprodukte des Actomyosins mit ATP zu isolieren und auf Grund ihrer charakteristischen Eigenschaften als Actin und Myosin zu identifizieren (11). Auch NODA und MARUYAMA sind der Meinung, dass die Dissoziationstheorie die adäquateste Erklärung für die durch ATP hervorgerufenen Veränderungen bietet, obwohl ihre Versuchsergebnisse nicht mit Sicherheit darauf schliessen lassen (12). Dagegen folgert BLUM und MORALES aus Lichtstreuungsuntersuchungen mit und ohne ATP, dass ATP eine Veränderung der Form des Actomyosinmoleküls verursacht und nicht seine Dissoziation (17).

Aufbauend auf den Erfahrungen unseres Labors (W. SEITZ, H. NOWY) und den Arbeiten der DUBUISSON'schen Schule haben wir in den im folgenden beschriebenen Versuchen untersucht, welche Veränderungen ATP am Elektropherogramm von Actomyosin haltigen Herzmuskelextrakten hervorruft.

II. EIGENE VERSUCHE

Die Versuche wurden in der Zeit von März 1961 bis Oktober 1961 durchgeführt. Es wurde folgendes Tiermaterial verwendet:

linker Ventrikel und Vorhöfe von Hundeherzen,
rechter Ventrikel und Vorhöfe von Kaninchenherzen.

1. Methodik

- a) Herausnahme des Herzens: Die Kaninchen wurden mit 20 %iger Urethanlösung narkotisiert (3 ccm/1000 g Körpergewicht), in Rückenlage fixiert und der Thorax median eröffnet. Das schlagende Herz wurde aus dem Herzbeutel herausgenommen, von den Gefäßen abgetrennt und in eine Schale mit auf ca. 30° C erwärmter Tyrode-Lösung geworfen. Um es vollkommen blutleer zu machen, wurde das Herz als Langendorff-Präparat mit Tyrode-Lösung durchströmt und auf diese Weise auch die Coronarien von Blutresten befreit. Anschliessend wurde das Herz abgetrocknet, von einer Vielzahl in flüssigem Stickstoff gekühlter Nadeln, die auf einem Stempel saßen, durchbohrt und in flüssigem Stickstoff vollends durchgefroren. Die Hundeherzen stammten von in Pentothal-Narkose laparotomierten Tieren. In ähnlicher Weise wie bei den Kaninchen wurde das noch schlagende Herz herausgenommen, mit vorgewärmter Tyrode-Lösung durchströmt und in flüssigem Stickstoff durchgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Material in Dewargefäßen mit Kohlendäureschnee aufbewahrt.
- b) Herstellung des Herzmuskelextraktes: Bei der Präparation des Herzmuskels wurde sorgfältig darauf geachtet, dass das Material nicht auftaute. Deshalb erfolgten alle Manipulationen auf einer mit Trockeneis gekühlten Glasplatte; ebenso wurde Skalpell und Pinzette immer wieder gekühlt. Da für einen kompletten Versuch 4 g Material benötigt wurden, war es bei Versuchen mit Kaninchenherzen erforderlich, mehrere rechte Ventrikel bzw. Vorhöfe zusammenzulegen. Das zum Versuch benötigte Material wurde von Fettgewebe freipräpariert; es wurden 4 g abgewogen, kleingeschnitten und in einem auf Trockeneis gekühlten Mörser pulverisiert. Das auf diese Weise zerkleinerte Gewebe wurde in ein gekühltes Zentrifugenglas gefüllt und mit der doppelten Menge bzw. 7,5 ml eiskalter Weberlösung versetzt. Das Glas wurde verschlossen und im Kühlschrank auf ein von einem Elektromotor getriebenes Gerät gebracht, das durch Rotation den Inhalt des Glases in dauernder Bewegung hielt. Ausserdem wurde der Extrakt noch mehrmals von Hand umgeschüttelt. Die Extraktionsdauer betrug, je nach Tierart und Herzabschnitt, 30 Min. bzw. 2 Std. (Hundeherz - linker Ventrikel 30 Min., Hundeherz - Vorhöfe und Kaninchenherz 2 Std.). Nach dieser Zeit wurde der Ex-

trakt 10 Min. lang niedertourig vorzentrifugiert, der Überstand, nachdem oben schwimmendes Fett abgesaugt worden war, in Plastikbecher dekantiert und in der Kältezentrifuge 30 Min. lang bei 0° C hoctourig (16 000 Touren) zentrifugiert. Der nun klare Extrakt wurde in ca. 20 cm lange Dialysierschläuche gefüllt und in Messzylinder (100 ccm) mit eiskalter Pufferlösung der Ionenstärke $\mu = 0,45$, pH = 7,0 gehängt. Nach 1 - 2 Stunden wurde die Pufferlösung gewechselt. Die Dialysierdauer betrug ca. 18 Std. Nun wurde der Extrakt geteilt: der eine Teil - 1,88 ml - wurde mit 0,12 ml Puffer der Dialyse (= Pufferlösung, gegen die der Extrakt zuletzt dialysiert worden war) verdünnt, um das Verhältnis Muskelgewebe : Extraktionslösung = 1 : 2 zu erhalten. Er wurde zentrifugiert und diente dem Kontrollversuch. Der zweite Teil - 3,75 ml - wurde mit 0,25 ml Adenosintriphosphat-Lösung versetzt, die hergestellt wurde, indem 74,8 mg bzw. 7,48 mg ATP in 0,75 ml Pufferlösung der Dialyse gelöst wurden. Somit betrug die ATP-Konzentration 10^{-2} bzw. 10^{-3} Mol. Bei anderen Versuchen wurde der Extrakt mit Adenosindiphosphat (ADP) bzw. Adenosinmonophosphat (AMP) in 10^{-2} und 10^{-3} molarer Konzentration versetzt. Hierzu wurden 61,34 mg bzw. 6,13 mg ADP bzw. 41,7 mg bzw. 4,17 mg AMP in 0,75 ml Puffer gelöst. Der so behandelte Extrakt wurde 10 Min. lang in den Kühlschrank gestellt und dann 30 Min. hoctourig zentrifugiert. Anschliessend wurde ein Teil davon sofort zur Elektrophorese verwendet, während der andere Teil in Dialysiergefässe nach ANTWEILER gefüllt und gegen frischen Puffer der Ionenstärke $\mu = 0,45$ dialysiert wurde. Durch die Rückdialyse sollte das zugesetzte ATP bzw. ADP bzw. AMP wieder entfernt werden. Nach einer halben Stunde und nach einer Stunde wurde die Pufferlösung gewechselt. Die Dialysierdauer betrug zwischen 4 und 25 Stunden. Nach dieser Zeit wurde auch dieser Teil des Extraktes zur Elektrophorese verwendet. Ein kompletter Versuch umfasste also 3 Schritte:

1. Elektrophorese von normalem Extrakt- Kontrollversuch,
2. Elektrophorese von dem gleichen, jedoch mit ATP bzw. ADP bzw. AMP behandelten Extrakt,
3. Elektrophorese nach Rückdialyse des behandelten Extraktes.

Alle drei Schritte wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Es handelte sich dabei immer um Doppelbestimmungen, d. h. der gleiche Extrakt wurde zweimal kurz nacheinander elektrophoretisch untersucht.

Zusammensetzung der verwendeten Reagentien:

Weberlösung: $\mu = 0,67$, pH = 9,3

KCl	0,6 m	MG	74,553	-	44,730 g
NaHCO ₃	0,04 m	MG	84,015	-	3,360 g
Na ₂ CO ₃ · 10 H ₂ O	0,01 m	MG	286,164	-	2,861 g
Aqua bidest. ad					1.000,0

Pufferlösung nach DUBUISSON:

Ionenstärke $\mu = 0,45$, pH = 7,0

NaCl	0,3 m	MG 58,454	-	17,5362 g
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0,006 m	MG 156,025	-	0,9362 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0,048 m	MG 178,014	-	8,5447 g
Aqua bidest. ad				1.000,0

ATP: 5 - ATP - Na₂H₂-3 H₂O MG 623,2

ADP: 5 - ADP - Na₃·H₂O MG 511,2

AMP: Adenosin - 5 - Phosphorsäure MG 347,23

c) Mikroelektrophorese nach ANTWEILER:

Was den Aufbau des Mikrogerätes nach ANTWEILER, dessen Funktion und Bedienung betrifft, so sei auf die Arbeiten von ANTWEILER verwiesen (18, 19). Hier nur die wichtigsten Versuchsbedingungen:

Es wurde mit einer Stromstärke von 2,5 mA gearbeitet, die Spannung lag bei 20 - 22 V. Die Elektrophoresedauer betrug bei Extrakten aus Hundeherzen 90 Min., bei denjenigen aus Kaninchenherzen 100 Min. Die Entwicklung des Diagramms in der Svensson-Optik wurde bei einer Elektrophoresedauer von 90 Min. nach 60, 75, und 90 Min. nach Einschalten des Stromes photographisch festgehalten, bei einer Laufzeit von 100 Min. nach 60, 90 und 100 Minuten. (Film 14⁰ DIN, Belichtungszeit 10 Sekunden.)

2. Ergebnisse

Die Elektropherogramme eines normalen, d. h. nicht behandelten Herzmuskelextraktes wiesen 3 Hauptkomponenten - I, II und III - auf. Bei Ventrikel-extrakten war ausserdem eine Auftrennung der Komponente II in zwei Gipfel - α und β - deutlich zu erkennen (Abb. 1). Die Diagramme von Vorhöfen (Abb. 2) dagegen wiesen keine Unterteilung der Komponente II auf; ausserdem war sie nicht so hoch wie bei Ventrikel-extrakten. Dagegen war bei Vorhofextrakten Komponente III deutlicher ausgeprägt.

Die einzelnen Komponenten wurden folgendermassen identifiziert: (20)

Komponente I	= Myogen
Komponente II	= Myosinkomplex
α	= α -Myosin (Dubuisson)
	= S-Myosin (Weber) = Actomyosin
β	= β -Myosin (Dubuisson)
	= L-Myosin (Weber)
	= actinfreies Myosin
Komponente III	= Myoalbumin

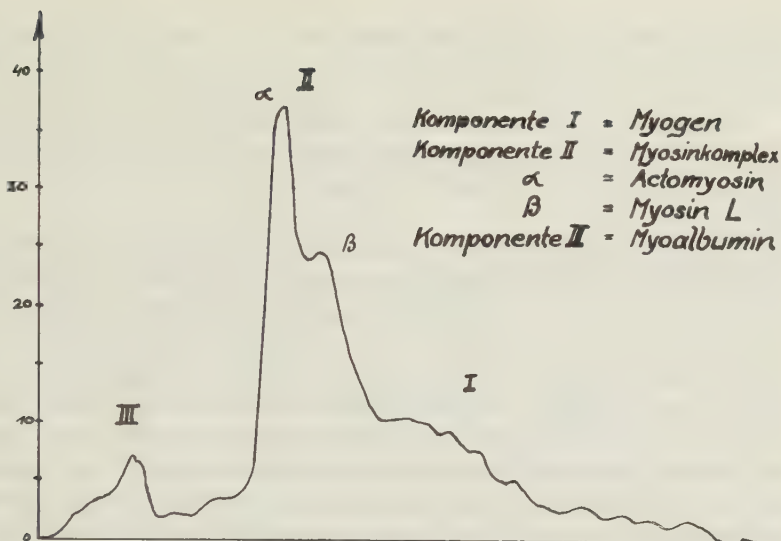


Abb. 1: Elektropherogramm eines normalen Extraktes aus Ventrikelmuskulatur (rechter Ventr.) von Kaninchen. Elektrophoreselaufzeit: 100 Min.; 20 V; 2.5 mA; $\mu = 0.45$

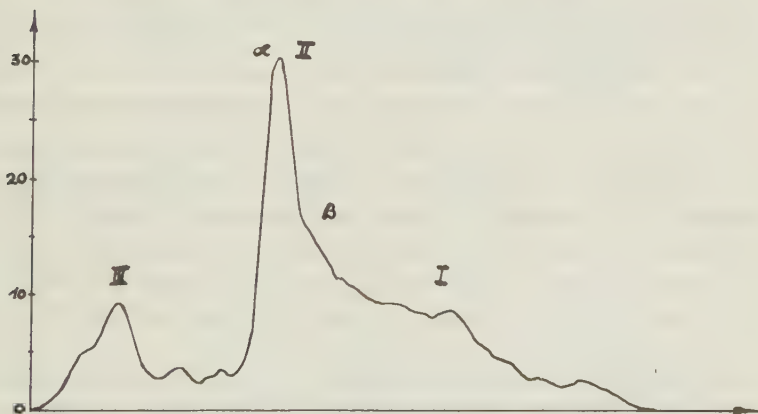


Abb. 2: Elektropherogramm eines normalen Extraktes aus Vorhofmyokard von Kaninchen. Elektrophoreselaufzeit: 90 Min.; 20 V; 2.5 mA; $\mu = 0.45$

Dabei wandert Komponente III - Myoalbumin - am schnellsten, Komponente I - Myogen - am langsamsten zur Anode.

Bei dem Vergleich von Kontrollelektropherogrammen mit Diagrammen von mit ATP behandelten Extrakten ergibt sich als auffälligster Befund bei Ventrikelextrakten die fehlende Aufteilung des Myosinkomplexes in zwei Gipfel (Abb. 3).

Die anstelle des Myosinkomplexes wandernde Komponente ist schmaler, höher und einheitlich. Ausserdem liegt eine geringfügige Vergrösserung der Komponente III vor. Ebenso sind an Diagrammen von Vorhofextrakten charakteristische Veränderungen festzustellen (Abb. 4); der Myosingipfel ist pyramidenförmig verbreitert und etwas niedriger als bei den Kontrollversuchen. Komponente III ist deutlich vergrössert, dagegen scheint Komponente I verkleinert zu sein. Diese eben beschriebenen Veränderungen treten ohne Unterschied sowohl bei 10^{-2} wie bei 10^{-3} molarer Konzentration des ATP im Extrakt auf (Abb. 7). Sie sind in gleicher Weise an Hunde- und Kaninchenherzen zu beobachten (Vergl. Abb. 6 und Abb. 7).

Durch Zusatz von ADP zum frischen Extrakt ist der gleiche Effekt zu erzielen, wie durch ATP; der Myosinkomplex weist nur mehr einen einheitlichen Gipfel auf, der Actomyosingipfel ist verschwunden (Abb. 5 b).

Keine Veränderungen am Elektropherogramm treten dagegen auf, wenn dem Extrakt AMP zugesetzt wird (Abb. 5 c).

In folgender Tabelle wird das Verhalten des Actomyosingipfels bei Zusatz von ATP, ADP und AMP noch einmal vergleichend dargestellt:

Material	ATP	ADP	AMP	Molarität
Hund				
Li. Ventrikel	- (3, 4)	- (6)	+ (7)	10^{-2}
Vorhöfe	- (5)			10^{-2}
Kaninchen				
Re. Ventrikel	- (8)	- (14)		10^{-2}
Re. Ventrikel	- (10)		+ (11)	10^{-3}
Vorhöfe	- (9)			10^{-2}
Vorhöfe	- (12)		+ (13)	10^{-3}

- : Actomyosingipfel nicht mehr vorhanden

+ : Actomyosingipfel vorhanden

() : Versuchsnummer

Nach genügend langer Dialyse des mit ATP oder ADP behandelten Extraktes gegen frische Pufferlösung zeigten die Elektropherogramme den gleichen Aufbau wie die Diagramme des Kontrollversuches. Komponente II wies bei Ventrikelextrakten wieder die charakteristische Auftrennung in zwei Gipfel auf (Abb. 7 c). Die durch das ATP bzw. ADP hervorgerufenen Veränderungen sind also reversibel. Um das ursprüngliche Bild zu erreichen, ist jedoch eine gewisse Dauer der Dialyse Voraussetzung. So ist z.B. nach 4 bis 8 Stunden Dialyse noch kein Hinweis auf das Vorhandensein von Actomyosin zu erkennen (Abb. 6 c). Erst nach 16 - 19 Stunden bildet sich andeutungsweise der zweite Gipfel des Myosinkomplexes heraus. Optimale Ergebnisse wurden bei einer Dialysierdauer von 22 - 25 Stunden erzielt.

Bei jedem Versuch wurde der pH-Wert des Extraktes bestimmt. Bei unbehandelten Extrakten lag er bei $\text{pH} = 7,0$. Nach Zusatz von ATP in 10^{-2} molarer Konzentration sank er auf $\text{pH} = 6,6$ bzw. $\text{pH} = 6,8$ bei 10^{-3} molarer Konzentration des ATP. Nach der Dialyse lag der pH-Wert wieder bei 7,0. Zusatz von ADP bewirkte keine Änderung des pH-Wertes. Dagegen sank er bei Zufügen von AMP in 10^{-2} molarer Konzentration auf $\text{pH} = 6,6$ und bei 10^{-3} mol. auf $\text{pH} = 6,8$. Allerdings blieb er bei einem Versuch unverändert bei $\text{pH} = 7,0$.

In einem zusätzlichen Versuch wurde der pH des Extraktes dadurch verändert, dass dieser gegen mit $n/10$ HCl angesäuerte Pufferlösung dialysiert wurde. Obwohl hierauf der pH bei 6,6 lag, war der Actomyosingipfel unverändert darstellbar, die Auftrennung des Myosinkomplexes war sogar deutlicher.

Ergänzend wurde noch ein Versuch mit homogenisiertem Material von Kaninchenvorhöfen gemacht. (Verhältnis Muskelgewebe : Extraktionslösung = 1 : 2.) Der hierbei gewonnene Extrakt war stark opalescent. Die Proteinkonzentration im Bereich der Komponente II war so hoch, dass interferometrisch nicht abgelesen werden konnte. Nach Zusatz von ATP in 10^{-3} molarer Konzentration kam es zur Schlierenbildung, der Extrakt klarte leicht auf, aber es konnte trotzdem nicht abgelesen werden. Der pH blieb unverändert bei 6,8. Erst nach Zugabe von ATP in 10^{-2} molarer Konzentration wurde der Extrakt vollkommen klar, der pH betrug 6,6 und es konnte ohne Schwierigkeiten abgelesen werden. Das Kurvenbild ähnelt sehr dem von mit ATP behandelten Extrakten von nicht homogenisierten Vorhöfen. Im Gegensatz zu diesen jedoch ist hier Komponente III und II nicht so weit auseinandergezogen; Komponente III überragt Komponente II. Nach der Rückdialyse war eine interferometrische Ablesung wieder nicht mehr möglich.

Die Elektropherogramme von Hundemyokardextrakten weisen den gleichen Aufbau auf wie die von Extrakten aus Kaninchenherzmuskulatur. Das gleiche gilt für die ATP-Diagramme (Vergl. Abb. 6 u. 7). Obwohl unter glei-

chen Bedingungen gearbeitet wurde, ist die Konzentration der gesamtlöslichen Proteine bei Extrakten aus Hundeherzen höher als bei denjenigen aus Kaninchenherzen, sowohl was Vorhöfe wie Ventrikel betrifft (Hundeherz Vorhöfe 1,4 %, Kaninchenherz Vorhöfe 1,12 %; Hundeherz li. Ventrikel 1,97 %, Kaninchenherz re. Ventrikel 1,5 %). Wir haben zwar bei unseren Versuchen nur linken Ventrikel vom Hund und nur rechten Ventrikel vom Kaninchen untersucht, doch übertrifft der Konzentrationsunterschied zwischen Hunde- und Kaninchenextrakten weit denjenigen, der zwischen den Extrakten von rechtem und linkem Ventrikel einer Tierart besteht (Konzentrations-Differenz Hundeherz li. Ventrikel - Kaninchenherz re. Ventrikel ca. 0,47 %; Konzentrations-Differenz Kaninchenherz li. Ventrikel - re. Ventrikel ca. 0,13 %). Besonders gross sind die Konzentrationsunterschiede im Bereich des Myosinkomplexes, aber auch beim Myogen sind sie deutlich. Dagegen ist der Myoalbuminanteil beim Hundeherz niedriger als beim Kaninchenherz.

Weiterhin fiel auf, dass die Auftrennung des Myosinkomplexes in zwei Gipfel bei Ventrikelextrakten aus Hundeherzen schneller erfolgte als bei denjenigen aus Kaninchenherzen. Bei den ersteren waren die zwei Gipfel bereits nach 90 Minuten deutlich auseinandergezogen, während bei den letzteren dies erst nach 100 Minuten der Fall war.

Bei der planimetrischen Auswertung der Diagramme ergab sich, dass die 6 Elektropherogramme, die zu einem kompletten Versuch gehören, untereinander vollkommen flächengleich sind.

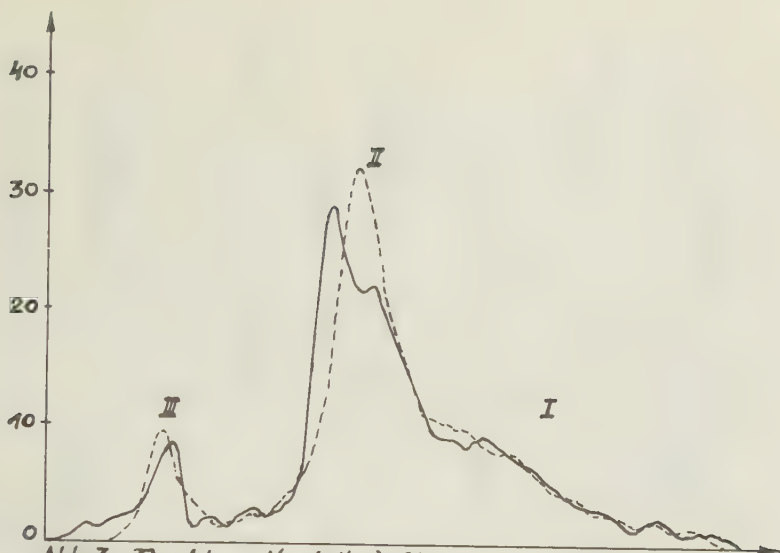


Abb. 3: Rechter Ventrikel, Kaninchen ATP 10^{-3} mol.
 $t = 100$ Min., 20 V., 2.5 mA., $\mu = 0.45$

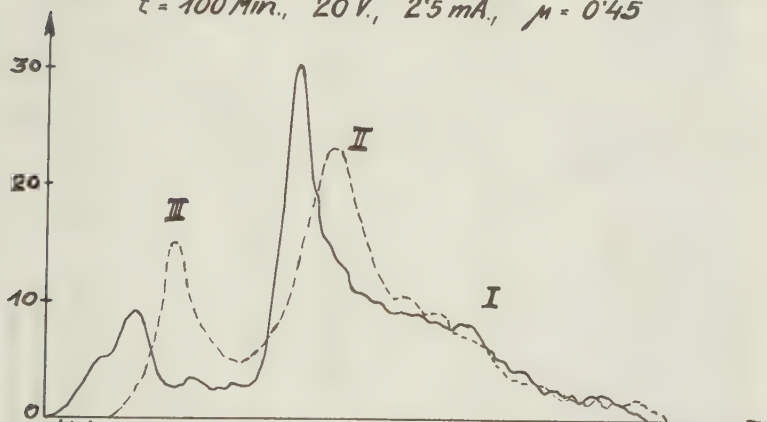
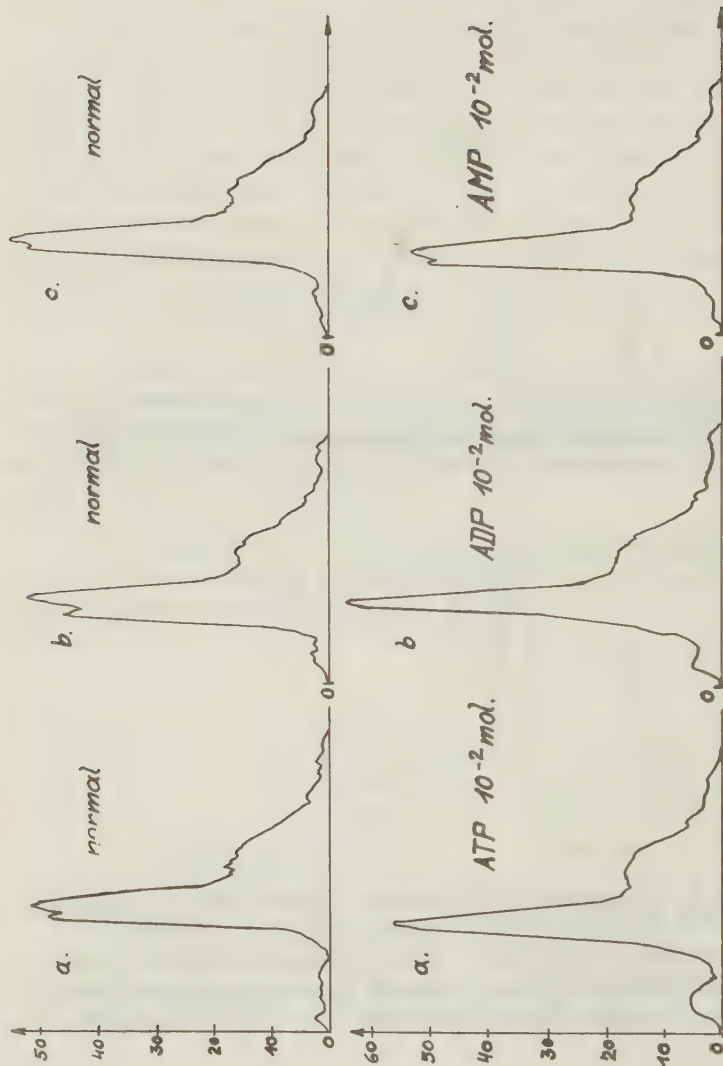


Abb. 4: Vorhöfe, Kaninchen. Elektrophoreselauf-
zeit $t = 90$ Min., 20 V., 2.5 mA., $\mu = 0.45$;
Elektropherogramme von normalem Extrakt u. von
mit ATP behandeltem Extrakt übereinanderprojiziert:
—— normales Epherogramm, ----- ATP-Diagramm



Abl. 5: Wirkung von ATP, ADP u. AMP auf Herzmuskelextrakte (Hund):

Oben: E'pherogramme normaler Ventrikulextrakte;

Unten: E'pherogramme der gleichen Extrakte nach Zusatz von ATP (10^{-2} mol.) (a.), ADP (10^{-2} mol.) (b.), AMP (10^{-2} mol.) (c.). Elektrophoreselaufzeit $t = 90$ Min., 20-24 V., 2.5 mA., $\mu = 0.45$.

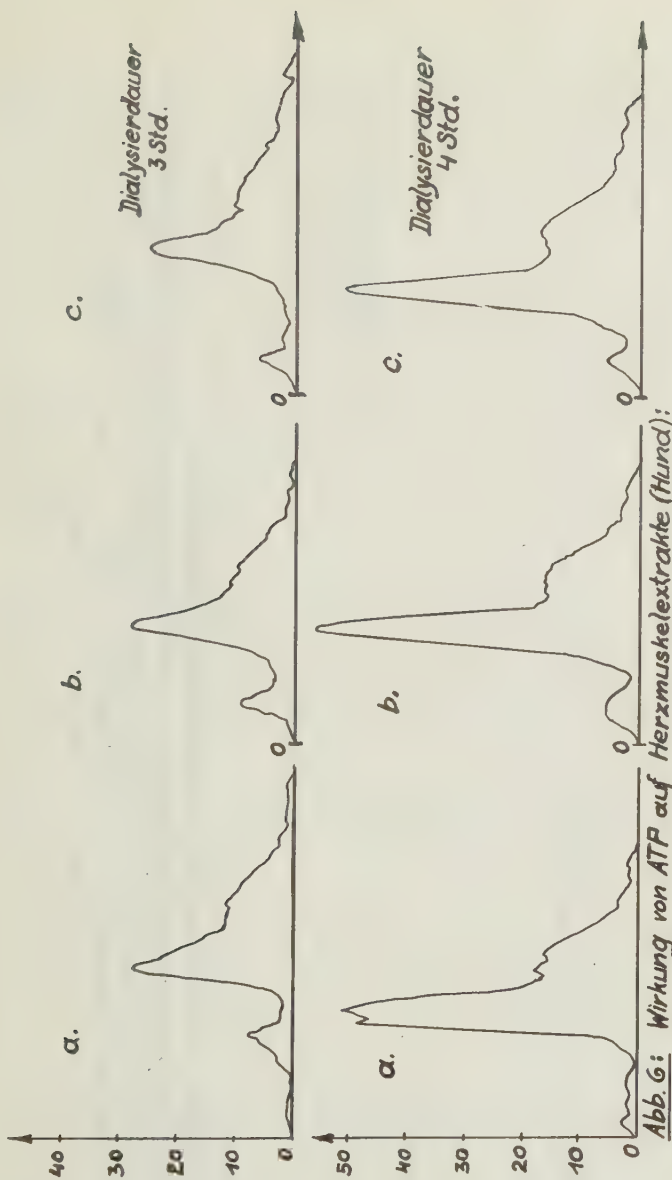


Abb. 6: Wirkung von ATP auf Herzmuskelextrakte (Hund);

Oben: Elektropherogramme von Extrakt aus Vorhofmuskulatur;

Unten: Elektropherogramme von Extrakt aus Ventrikelmuskulatur (linker Ventr.);

a. normales Elektropherogramm; b. nach Zusatz v. ATP (40 μ mol); c. nach Rückdialyse.

Elektrophoreselaufzeit $t = 90 \text{ Min.}$, 20-24 V., 2.5 mA., $\mu = 0.45$.

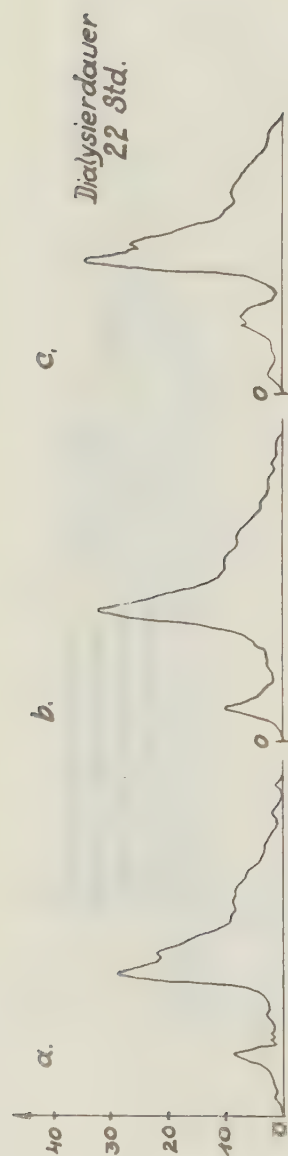


Abb. 7: Wirkung von ATP auf Herzmuskelextrakte (Warinchen):

Ober: Ephero-gramme von Extrakt aus Ventrikelmuskulatur (rechter Ventri.) ATP 10^{-3} mol, $t = 100$ Min,

Unten: Ephero-gramme von Extrakt aus Vorhofmuskulatur ATP 10^{-2} mol, $t = 90$ Min,

a. normales Ephero-gramm b. nach Zusatz von ATP c. nach Rückdialyse

20 - 24 V, 2.5 mA, $\mu = 0.45$

III. DISKUSSION

Eine der schonendsten Möglichkeiten zur Analyse von Muskelextrakten ist die Elektrophorese, denn am Extrakt werden, abgesehen von der Dialyse, keinerlei Veränderungen vorgenommen. Ausserdem ist in einfacher Weise eine Beurteilung der einzelnen Eiweissanteile sowie deren Relation zueinander möglich (22). Daher schien uns die Methode besonders geeignet, die Wirkung des ATP auf die Herzmuskelproteine zu studieren.

Wie man bereits weiss, besteht eine Wechselwirkung zwischen ATP und dem Myosinkomplex. Von einem Einfluss des ATP auf die übrigen Muskelproteine ist unseres Wissens nichts bekannt. Wir konnten bei unseren Versuchen also annehmen, dass auf Einwirkung von ATP hin Veränderungen im Bereich von Komponente II auftreten werden; von Komponente I und III wäre zu erwarten gewesen, dass sie unverändert bleiben. Dies trifft jedoch für Komponente III nicht zu: sie weist im Elektropherogramm des mit ATP behandelten Extraktes regelmässig eine, wenn auch geringfügige, Konzentrationszunahme auf.

Die auffälligste Veränderung an Komponente II war das Verschwinden von Gipfel α . Projiziert man normales Elektropherogramm und ATP-Diagramm desselben Extraktes übereinander (Abb. 3), so liegt Gradient II des ATP-Diagramms dort, wo im normalen Elektropherogramm Gipfel β liegt. Es dürfte also Gradient II mit L-Myosin identisch sein. Gegenüber Gipfel β weist Gradient II jedoch eine höhere Konzentration auf. Die Flächenabnahme im Bereich von Gipfel α entspricht der Summe der Flächenzunahme bei Gradient II und Komponente III, wobei etwa 80 % auf Gradient II und etwa 20 % auf Komponente III entfallen. Eine Erklärung für diese Erscheinungen mag die Spaltung des Actomyosins durch ATP in zwei Eiweisskörper mit verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit liefern, wobei es sich offenbar um Actin und Myosin handelt. Die höhere Konzentration von Gradient II als von Gipfel β wird also wohl durch das aus Actomyosin entstandene L-Myosin bedingt sein, denn es ist kein anderer Muskeleiweisskörper bekannt, der die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit hätte, wie das L-Myosin. Die Konzentrationszunahme im Bereich von Komponente III ist wahrscheinlich auf das Actin zurückzuführen, das nach DUBUISSON im Elektropherogramm eine schnell wandernde Komponente im Bereich des Myoalbumins bildet (23).

Die Tatsache, dass nach einer bestimmten Dialysierdauer des mit ATP behandelten Extraktes gegen frische Pufferlösung wieder ein völlig normales Elektropherogramm erhalten wird, beweist, dass die durch ATP am Myosinkomplex hervorgerufenen Veränderungen reversibel sind: sobald im Extrakt kein ATP mehr vorhanden ist, kann das dissoziierte Myosin und Actin sich zu Actomyosin ver-

binden. Dies stimmt mit den Versuchsergebnissen von NEEDHAM und Mitarbeitern sowie NODA und MARUYAMA überein (6, 12).

Die Wirkung des ADP auf den Myosinkomplex ist qualitativ gleich der des ATP. Die Erklärung dafür bietet eine Beobachtung von KALCKAR, derzufolge das ADP durch die im Muskelextrakt vorhandene Myokinase zu ATP und AMP dismutiert wird ($2 \text{ ADP} \longrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$) (24). Da durch Zusatz von AMP zum Extrakt keinerlei Effekt an den Eiweisskörpern zu beobachten war, scheinen die Veränderungen am Myosinkomplex eine spezifische Wirkung des ATP zu sein, d. h. die Triphosphatgruppe ist ausschlaggebend und nicht die Adenosingruppe (15). Ebenso haben Verschiebungen des pH-Wertes zur sauren Seite hin keinen Einfluss auf den Myosinkomplex.

Die Änderung des pH-Wertes bei Zusatz von ATP lässt sich durch die enzymatische Hydrolyse der ersten Phosphorsäure des ATP durch Myosin erklären. ADP verursacht vermutlich deshalb keine pH-Änderung, weil das freigewordene Säureäquivalent durch die desamidierter Gruppe neutralisiert wird (25, 21).

Sowohl die normalen Elektropherogramme wie die ATP-Diagramme von Vorhofextrakten unterscheiden sich etwas von denjenigen der Ventrikelextrakte. Dies beruht wohl z. T. auf quantitativen Unterschieden in der Eiweisszusammensetzung von Vorhof- und Ventrikelmuskulatur (26). Bereits die Gesamteiweisskonzentration ist in Extrakten von Vorhöfen niedriger als in den von rechten Ventrikeln. Der Myoalbuminanteil an den gesamtlöslichen Proteinen ist im Vorhofmyokard relativ höher als im Myokard von rechten Ventrikeln, dagegen ist der Myosin- und Myogenanteil geringer (20, 27). Insbesondere scheint die Konzentration des freien L-Myosins niedrig zu sein, denn man vermisst die bei Ventrikelextrakten regelmässig wiederkehrende Aufteilung des Myosinkomplexes in zwei Gipfel. Dies würde mit der Beobachtung von KOVÄTS übereinstimmen, derzufolge aus Vorhöfen weniger Myosin extrahiert werden kann (28). Jedoch wird man auch in Vorhof-Elektropherogrammen das L-Myosin an der gleichen Stelle zu suchen haben, wie bei Ventrikel-Elektropherogrammen, nämlich im Anschluss an Gipfel α . Allerdings ist eine genaue Abgrenzung des L-Myosins gegen das Myogen nicht möglich.

Extrakte aus Vorhofmuskulatur reagieren auf Zusatz von ATP grundsätzlich genauso, wie Ventrikelextrakte. Projiziert man ein normales Vorhof-Diagramm und das Diagramm eines mit ATP behandelten Vorhofextraktes unter der Annahme, dass auch hier Komponente I unverändert bleibt, übereinander, so liegt der grosse breite Gradient II des ATP-Diagramms dort, wo wir im normalen Elektropherogramm das L-Myosin vermutet haben (Abb. 4). Gegenüber dem normalen Elektropherogramm fällt weiterhin auf, dass Gipfel α fehlt und die Konzentra-

tion im Bereich von L-Myosin und Myoalbumin zugenommen hat, d. h. also, dass im Extrakt kein Actomyosin vorhanden ist, während bei L-Myosin und Myoalbumin ein Mehr an Eiweiss vorliegt. Wir können also annehmen, dass die genannten Veränderungen wiederum ihre Ursache in der durch ATP bedingten Dissoziation des Actomyosins in Actin und L-Myosin haben.

Es ist schwer, eine Erklärung dafür zu finden, warum bei Vorhöfen die Abszissenaustrdehnung des ATP-Diagrammes geringer ist wie die des normalen Elektropherogrammes, wohingegen bei Ventrikelextrakten ATP-Diagramm und normales Elektropherogramm unter gleichen Versuchsbedingungen in der Abszisse etwa die gleiche Ausdehnung haben. Die Ursache liegt vermutlich bei Komponente III, die im ATP-Diagramm eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit zu haben scheint. Vielleicht ist der Grund dafür das Actin, das nach CRUCK sich bei der Elektrophorese je nach Myokardabschnitt unterschiedlich verhalten soll (27).

Bei unseren Versuchen haben wir Material zweier verschiedener Tierarten verwendet, doch waren die Ergebnisse, was die Wirkung von ATP betrifft, bei Extrakten aus Hunde- wie aus Kaninchenherzen gleich. Es finden sich also, zumindest was die kontraktilen Proteine betrifft, keine elektrophoretisch fassbaren qualitativen Unterschiede in der Myokardeiweisszusammensetzung der beiden Tierarten. Dagegen sind die bestehenden Differenzen bezüglich der quantitativen Verteilung der einzelnen Eiweissanteile sowie der Konzentration der gesamtlöslichen Proteine wahrscheinlich entweder auf den Artunterschied oder auf eine unterschiedliche Extrahierbarkeit zurückzuführen. Die Verschiebung der Relation Actomyosin : Myosin zugunsten des Myosins bei Ventrikelextrakten beruht vermutlich auf der kürzeren Extraktionszeit der Hundeherzen gegenüber den Kaninchenherzen. Es ist ja bekannt, dass bei kurzer Extraktionsdauer das L-Myosin überwiegt, während bei längerer Extraktion das Mengenverhältnis sich zugunsten des Actomyosins verschiebt (29).

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Mikroelektrophorese nach ANTWEILER wurde der Einfluss von ATP auf Herzmuskelextrakte untersucht.

Zur Gewinnung der Extrakte verwendeten wir rechten Ventrikel und Vorhöfe von Kaninchenherzen sowie linken Ventrikel und Vorhöfe von Hundeherzen. Das grob zerkleinerte Material wurde mit zwei Teilen Weberlösung ($\mu = 0,67$, pH = 9,3) vermischt und 30 Min. bzw. 2 Std. lang extrahiert. Nach

18-stündiger Dialyse des Extraktes gegen Pufferlösung der Ionenstärke $\mu = 0,45$ folgte die elektrophoretische Analyse desselben. Diese bestand aus 3 Abschnitten:

1. Elektrophorese von normalem Extrakt (Kontrollelektropherogramm),
2. Elektrophorese desselben Extraktes nach Zusatz von ATP (ATP-Diagramm),
3. Elektrophorese des mit ATP behandelten Extraktes, nachdem dieser gegen frische Pufferlösung ($\mu = 0,45$) dialysiert, d. h. ATP wieder entfernt worden war.

Die Elektrophoresedauer betrug bei Hundemyokardextrakten 90 Min., bei Extrakten aus Kaninchenmyokard 90 bzw. 100 Min.

Es wurden folgende Beobachtungen gemacht:

1. Das Kontrollelektropherogramm wies bei allen Versuchen die charakteristische Auftrennung in 3 Komponenten auf:

Komponente I	- Myogen
Komponente II	- Myosinkomplex
Komponente III	- Myoalbumin.

Bei Ventrikelextrakten war Komponente II ausserdem in zwei Gipfel aufgetrennt:

Gipfel α	= Actomyosin
Gipfel β	= L-Myosin.

2. Nach Zusatz von ATP verschwand Gipfel α ; gleichzeitig fand eine Konzentrationszunahme im Bereich von Gipfel β und Komponente III statt. Komponente I blieb unverändert. Sowohl bei 10^{-2} wie bei 10^{-3} molarer Konzentration des ATP im Extrakt war die Wirkung gleich.
3. Dieselben Veränderungen am Elektropherogramm traten nach Zusatz von ADP auf, das ebenfalls sowohl in 10^{-2} wie in 10^{-3} molarer Konzentration gleich wirksam war. Keinen Einfluss auf das Elektropherogramm hatte AMP. Ebenso blieben Verschiebungen des pH-Wertes zur sauren Seite hin unwirksam.
4. Die durch ATP bzw. ADP hervorgerufenen Veränderungen sind reversibel. Es ist jedoch eine bestimmte Dialysierdauer Voraussetzung (ca. 20 Std.).

5. ATP übt auf Extrakte von Vorhofmyokard den gleichen Einfluss aus wie auf Extrakte von Ventrikelmuskulatur. Es bestehen keine Unterschiede in der Wirkung des ATP bei den untersuchten Tierarten.

Unsere Beobachtungen haben wir folgendermassen gedeutet:

Durch Zusatz von ATP wird das in den Proteinlösungen enthaltene Actomyosin in Actin und Myosin dissoziiert. Dadurch verschwindet im Elektropherogramm Gipfel α . Da die Wanderungsgeschwindigkeit des freien Actins ungefähr derjenigen des Myoalbumins entspricht, ist die Konzentrationszunahme im Bereich von Komponente III durch Actin bedingt. Die Konzentrationszunahme im Bereich von Gradient II ist durch freigewordenes Myosin verursacht.

Was den Myosinkomplex betrifft, bestehen, soweit wir es beurteilen können, keine qualitativen Unterschiede zwischen den verschiedenen Myokardabschnitten und auch nicht zwischen den untersuchten Tierarten.

An dieser Stelle sei mir erlaubt, Herrn Prof. Dr. H. NOWY zu danken für die Überlassung des Themas sowie für das Interesse und die wohlwollende Unterstützung, die er meiner Arbeit zuteil werden liess.

Herrn Dr. D. FRINGS danke ich für die technische Hilfe bei der Ausführung der Versuche.

LITERATUR

- 1) ENGELHARDT, W. A. und LJUBIMOWA, M. N.
Myosine and Adenosinetriphosphatase.
Nature 144 (1939) 668
- 2) POLIS, B.D. und MEYERHOF, O.
Studies on Adenosinetriphosphatase in Muscle.
J. of Biol. Chem. 169 (1947) 389
- 3) ENGELHARDT, W. A. und LJUBIMOWA, M. N.
zitiert nach H. PORTZEHL, G. SCHRAMM u. H. H.
WEBER: Actomyosin und seine Komponenten.
Z. Naturforsch. 5 b (1950) 61
- 4) SZENT-GYÖRGYI, A.
Chemistry of Muscular Contraction
N. Y., Academic Press Inc.
Publishers (1947)
- 5) SZENT-GYÖRGYI, A. und BANGA, I.
Adenosinetriphosphatase.
Science 93 (1941) 158
- 6) NEEDHAM, J., SHEN, S.C., NEEDHAM, D.M., LAWRENCE, A.S.C.
Myosine Birefringence and Adenylpyrophosphate.
Nature 147 (1941) 766
- 7) SZENT-GYÖRGYI, A.
zitiert nach H. PORTZEHL, G. SCHRAMM u. H. H.
WEBER: Actomyosin und seine Komponenten.
Z. Naturforsch. 5 b (1950) 61
- 8) STRAUB, F.B. zitiert nach PORTZEHL, H., SCHRAMM, G. und
WEBER, H. H. : Actomyosin und seine Komponenten.
Z. Naturforsch. 5 b (1950) 61
- 9) WEBER, H. H. Muskelproteine.
Biochim. biophys. Acta 4 (1950) 12
- 10) PORTZEHL, H., SCHRAMM, G. und WEBER, H. H.
Actomyosin und seine Komponenten.
Z. Naturforsch. 5 b (1950) 61

- 11) WEBER, A. The Ultracentrifugal Separation of L-Myosin and Actin
under the Influence of ATP.
Biochim. biophys. Acta 19 (1956) 345
- 12) NODA, H. und MARUYAMA, K.
Interaction of Myosin B with Adenosine Triphosphate.
A Flow-Birefringence Study.
Biochim. biophys. Acta 30 (1958) 598
- 13) KOREY, S. Some Factors influencing the Contractility of a non-
conducting Fiber Preparation.
Biochim. biophys. Acta 4 (1950) 58
- 14) AMBERSON, W. R., ERDÖS, T., CHINN, B. und LUDS, H.
Electrophoretic and Ultracentrifugal Analyses of Proteins
extracted from whole Mammalian Muscles.
J. of Biol. Chem. 181 (1949) 405
- 15) ENGELHARDT, W. A.
Adenosinetriphosphatase Properties of Myosin.
Advances in Enzymology 6 (1946) 147
- 16) HASSELBACH, W.
Die Nucleosidtriphosphatase-Aktivität von L-Myosin u.
Aktomyosin in Abhängigkeit von den ionalen Bedingungen.
Biochim. biophys. Acta 25 (1957) 365
- 17) BLUM, J. J. und MORALES, M. F.
The Interaction of Myosin with Adenosine Triphosphate,
Arch. Biochem. 43 (1953) 208
- 18) ANTWEILER, H. J.
Quantitative Mikroelektrophorese.
Kolloid-Z. 115 (1949) 130
- 19) ANTWEILER, H. J.
Die quantitative Elektrophorese in der Medizin.
Berlin, Springer Verlag 1952
- 20) GUHL, H. Elektrophoretische Untersuchungen an Kaninchenherzen.
Dissertation, München 1961
- 21) BANGA, I. The Enzymatic Reactions of Dinucleotide and ADP₁ with
Myosin.
Hung. Acta Physiol. 1 (1948) 72

- 22) DUBUISSON, M. Modifications dans la structure physico-chimique de l'édifice contractile au cours du cycle de la contraction musculaire.
Biochim. biophys. Acta 4 (1950) 25
- 23) DUBUISSON, M. Einfluss der Ionenart auf die Extrahierbarkeit von Proteinen aus ruhenden od. kontrahierten Muskeln.
Biochim. biophys. Acta 5 (1950) 489
- 24) KALCKAR, H. M. Adenylpyrophosphatase and Myokinase.
J. of Biol. Chem. 153 (1944) 355
- 25) FABRY-HAMOIR, C.
Contribution a l'étude de la combinaison Actomyosine - ATP.
Biochim. biophys. Acta 4 (1950) 445
- 26) NOWY, H. und SEITZ, W.
Elektrophoretische Untersuchungen von Extrakten verschiedener Abschnitte des in Diastole, Systole und Starre fixierten Kaninchenherzens.
Zschr. ges. exper. Medizin 126 (1955) 1
- 27) CRUCK, S. Contribution a la biochimie comparée des protéines musculaires dans les différents compartiments du coeur.
Biochim. biophys. Acta 10 (1953) 630
- 28) KOVATS, J. Myosin and Actomyosin Content of the Heart Muscle.
Nature 163 (1949) 606
- 29) NODA, H. und MARUYAMA, K.
Flow birefringence properties of various Myosin B preparations.
Biochim. biophys. Acta 32 (1959) 263

LEBENS LAUF

Am 13. Februar 1939 wurde ich, Angelika Silvija RUGIENIUS als erstes Kind des Diplom-Juristen Isidor Rugienius und seiner Ehefrau Evelina Rugienius, geb. Riauba, in Kaunas, Litauen, geboren.

1944 flohen meine Eltern mit mir nach Deutschland.

1945 zogen wir nach München, wo ich im Herbst des gleichen Jahres in die Volksschule eintrat. Von 1948 bis 1957 besuchte ich das Realgymnasium der Armen Schulschwestern am Anger in München und machte hier das Abitur.

Im Herbst 1957 begann ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität München. Im Frühjahr 1959 legte ich hier die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1960 die ärztliche Vorprüfung ab. '

Auch im klinischen Teil setzte ich das Medizinstudium in München fort. Im Juli 1963 schloss ich es mit dem Staatsexamen ab.

